



出芽酵母を用いた新規アドリアマイシン耐性獲得機構の解析

著者	高橋 勉
号	350
発行年	2003
URL	http://hdl.handle.net/10097/15314

氏 名 (本籍) ^{たか}高 ^{はし}橋 ^{つとむ}勉

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 博 第 3 5 0 号

学位授与年月日 平 成 16 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 、 専 攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 生命薬学専攻

学 位 論 文 題 目

出芽酵母を用いた新規アドリアマイシン耐性獲得機構の解析

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 永 沼 章

教 授 榎 本 武 美

助教授 平 澤 典 保

論文内容要旨

アドリアマイシンは癌の化学療法に幅広く用いられている抗癌剤の一つであるが、耐性癌細胞の出現が本薬剤を利用する上で大きな妨げとなっている。本研究では新しいアドリアマイシン耐性獲得機構の解明を目的として、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いてアドリアマイシン耐性に関与する遺伝子の検索を試みた。出芽酵母は全ゲノム配列が決定されており、遺伝学的解析が容易である。また、酵母の遺伝子産物の多くはその機能がヒトを含む高等生物と共有することから、酵母は真核生物の有用なモデルであり、酵母を用いたスクリーニングによって見出される細胞内因子がヒトにも共通して存在することが期待できる。

酵母にアドリアマイシン耐性を与える細胞内因子の検索

本研究では、アドリアマイシン耐性に関与する新たな細胞内因子の同定を目的として、酵母 genomic DNA library 中から酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子を検索した。その結果、高発現によって酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子として *SSL2*, *BSD2*, および *YBRO59c* を同定することに成功した。

Ss12 高発現によるアドリアマイシン耐性獲得機構の解析

Ss12 は酵母基本転写因子 TFIIF のサブユニットとして転写の開始および DNA のヌクレオチド除去修復 (NER) に関与する DNA ヘリカーゼであり、酵母の生存に必須の蛋白質であることが知られている。まず、これまでに知られている Ss12 の機能とアドリアマイシン耐性との関係を検討したところ、Ss12 高発現は酵母の RNA 合成活性および NER 活性を上昇させることなく酵母にアドリアマイシン耐性を与えることが明らかとなった。NER 活性がアドリアマイシン耐性に関与しないことは、NER 活性に必要な C 末端領域を欠失した変異 Ss12 を高発現させても酵母がアドリアマイシン耐性を示すことから支持された。さらに、様々な部分欠失変異 Ss12 を酵母に高発現させてアドリアマイシン感受性に対する影響を調べた結果、Ss12 の 843 アミノ酸中で 81 番目から 750 番目までの中間領域が全てアドリアマイシン耐性に必要であることが判明し、さらにこの領域は酵母の生存維持に必要な Ss12 内領域と一致した。なお、この中間領域中にはヘリカーゼモチーフが含まれるが、Ss12 以外の酵母ヘリカーゼ (Red3 および Sgs1) を高発現させてもアドリアマイシン感受性にはほとんど影響が認められなかった。この結果は、単に細胞内のヘリカーゼ活性が上昇しただけでは酵母はアドリアマイシンに対して耐性を示さないことを示している。以上の結果から、Ss12 が有する酵母の生存に必須な機能が、アドリアマイシンの毒性に対して防御的な役割を果たしていると考えられる。

Bsd2 高発現によるアドリアマイシン耐性獲得機構の解析

Bsd2 の機能はほとんど解明されていないが、欠損によって金属トランスポーターである Smf1 および

Smf2の細胞内濃度が上昇することから、Smf1およびSmf2の濃度を負に制御する因子であると考えられている。そこで、まずSmf1およびSmf2を欠損した酵母のアドリアマイシン感受性を調べたところ、Smf2欠損酵母は顕著な耐性を示し、Smf1欠損酵母もわずかながら耐性を示した。また、Smf1およびSmf2を共に欠損した酵母にBsd2を高発現させた場合にも、正常酵母にBsd2を高発現した場合と同程度のアドリアマイシン耐性が認められた。したがって、Bsd2高発現によるアドリアマイシン耐性獲得機構にはSmf1およびSmf2以外の因子の関与が大きいと考えられる。一方、Smf1およびSmf2欠損酵母にBsd2を高発現させても、相加的（または相乗的）な耐性度の上昇が認められなかったことから、Bsd2高発現酵母の示すアドリアマイシン耐性にSmf1およびSmf2も何らかの形で関わっていると考えられる。しかし、Bsd2高発現酵母はSmf1およびSmf2の両者を共に欠損した酵母が示すEGAT高感受性やMn-SOD活性の低下が認められなかった。また、Bsd2高発現はSmf2の細胞内濃度をわずかに減少させたのみであった。したがって、Bsd2はこれまで知られていたSmf1およびSmf2の細胞内濃度低下作用とは異なる未知の機能によって酵母にアドリアマイシン耐性を与えていると考えられる。

一方、Bsd2欠損酵母はアドリアマイシンに対して高い感受性を示し、細胞内へのアドリアマイシン取り込み能が高いことが明らかになった。前述したようにBsd2欠損によってSmf1およびSmf2の細胞内濃度は増加するが、細胞内のアドリアマイシン蓄積量はSmf2の高発現によって増加し、欠損によって減少した。したがってSmf2がアドリアマイシンの細胞内蓄積に密接に関与している可能性が考えられる。Bsd2は欠損するとSmf1およびSmf2の細胞内濃度が上昇し、そこにBsd2が発現すれば、両者の濃度はその発現程度に応じて低下するものの、正常細胞中のBsd2濃度がすでに充分量に達しているために、それ以上Bsd2を高発現させてもSmf1およびSmf2濃度に影響を及ぼさないと考えられる。したがって、Bsd2の高発現と欠損は異なる機構でアドリアマイシンの毒性発現に影響を与えている可能性が考えられる。

Ybr059c 高発現によるアドリアマイシン耐性獲得機構の解析

Ybr059cはそのアミノ酸配列上の特徴から、セリンスレオニンキナーゼであるArk1およびPrk1と同様の機能を有していると考えられている。これらの3つの蛋白質は細胞骨格形成およびエンドサイトーシスに関わるArk1/Prk1ファミリーに属しており、N末端にキナーゼドメインを有している。

まず、Ark1/Prk1ファミリー（Ark1、Prk1およびYbr059c）のアドリアマイシン感受性に与える影響を検討したところ、Ybr059cとPrk1のみがアドリアマイシン耐性獲得に関与していることが明らかとなった。Prk1は細胞骨格形成やエンドサイトーシスに関わる基質蛋白質をリン酸化する。その中でYbr059cによるアドリアマイシン耐性獲得にはSlalの存在が必須であることが明らかとなった。SlalはPan1およびEnd3とともに3者複合体（Slal/Pan1/End3 complex）を形成している。Prk1高発現はSlalおよびPan1をリン酸化することで、この複合体の解離を促進し、エンドサイトーシスの低下を引き起こしていると考えられている。本研究によってYbr059c高発現が、Prk1高発現と同様に、Pan1のリン酸化を促進することおよびエンドサイトーシスの異常を引き起こすことが明らかになった。したがって、Ybr059cはリン酸化を介してSlal/Pan1/End3 complexの機能、すなわちエンドサイトーシス能を低下させることでアドリアマイシンの

毒性を軽減していると考えられる。

本研究によって見出された3つのアドリアマイシン耐性因子 Ssl2, Bsd2 および Ybr059c を高発現する酵母は全てがRNA合成阻害剤であるアクチノマイシンDに対しても耐性を示した, アドリアマイシンと同じアントラサイクリン系の抗癌剤であるアクラルビシンに対しては耐性を示さないという興味深い結果も得られた。アントラサイクリン系抗癌剤は類似の作用機構を有しているが, その抗腫瘍スペクトルや副作用である心臓毒性の発現に大きな違いがあることが報告されている。また, アクチノマイシンDの毒性発現機序は多岐に渡っており, 未だに不明な点も多い。したがって, 本研究で見出されたアドリアマイシン耐性獲得機構の解明がこれらの薬剤の毒性発現機構解明においても重要な手掛りとなるのかもしれない。

本研究によってこれまで予想されなかった細胞内因子がアドリアマイシン耐性に関与することが明らかとなった。Ssl2, Ybr059c および Smf2 はヒト細胞にホモログが存在し, 同様の機能を有していることが知られている。したがって, この耐性機構の解明が癌細胞のアドリアマイシン耐性機構の全容解明に繋がることが期待される。

審査結果の要旨

アンスラサイクリン系の抗癌剤であるアドリアマイシンは癌の化学療法に幅広く用いられているが、耐性癌細胞の出現が本薬剤の有効利用の大きな妨げとなっている。本研究は新しいアドリアマイシン耐性獲得機構の解明を目的として、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) を用いてアドリアマイシン耐性に関与する遺伝子の検索を試み、3つの遺伝子 (*SSL2*, *BSD2* および *YBR059c*) を新しく見出すとともにその作用機構を検討したものである。

3つの遺伝子のうち、*SSL2*がコードする Ssl2は転写の開始およびDNAのヌクレオチド除去修復 (NER) に関与するDNAヘリカーゼであり、酵母の生存に必須の蛋白質である。本研究では、Ssl2高発現が酵母のRNA合成活性およびNER活性を上昇させることなく酵母にアドリアマイシン耐性を与えることを見出し、さらに、酵母の生存維持に必要なSsl2内領域がアドリアマイシン耐性獲得に必要な領域と同一であることを明らかにした。2つ目の遺伝子である*BSD2*がコードするBsd2は金属トランスポーターSmf2の細胞内濃度を負に制御する因子であると考えられている。本研究では、Bsd2高発現によるアドリアマイシン耐性獲得機構に、Smf2の細胞内濃度減少が一部関与するものの、それ以外の未知因子の関与がかなり大きいことを明らかにした。一方、Bsd2欠損酵母は細胞内へのアドリアマイシン取込み能が高く、アドリアマイシンに対して高感受性を示すことを見出し、この現象がSmf2によるアドリアマイシンの細胞内蓄積上昇作用によることを明らかにした。3つ目の遺伝子である*YBR059c*がコードするYbr059cはN末端にキナーゼドメインを有し、細胞骨格形成およびエンドサイトーシスに関わるArk1/Prk1ファミリーに属すると考えられているがその機能についての検討例はほとんどない。本研究では、Ark1/Prk1ファミリー (Ark1, Prk1 および Ybr059c) の中でYbr059cのみならずPrk1もアドリアマイシン耐性獲得に関与していることを明らかにし、Prk1がリン酸化する蛋白質の中でYbr059cによるアドリアマイシン耐性獲得にSlalの存在が必須であることを見出した。SlalはPan1およびEnd3とともに3者複合体 (Slal/Pan1/End3 complex) を形成するが、本研究では、Ybr059c高発現がPan1のリン酸化を促進することによって本complexの解離を促してエンドサイトーシスの異常を引き起こすことも明らかになった。

本論文はアドリアマイシン耐性獲得機構を解明する上で貴重な情報を提供するものであり、その学術的価値は極めて高い。よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。